

水稻白叶枯病原菌遗传和致病型多样性分析

姬广海, 何月秋, 张世光, 钱 君

(云南农业大学 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要:采用 Rep-PCR 分子指纹技术对国内已知致病型和云南省各水稻产区采集的 56 个白叶枯病代表菌株进行分析。用 ERIC、J3 等引物对其 DNA 进行 Rep-PCR 特异性扩增, 扩增结果经综合聚类分析, 在 70% 的相似水平上, 可将测试菌株划分为 10 个组群, 其中 4、5、8、9、10 为主要组群; 来自云南省的菌株分属于 6 个组群中, 遗传分群与菌株的地理来源关系密切。根据菌株在已知抗性基因的近等基因系的反应, 菌株可分为 18 个致病型, 云南省的水稻白叶枯病菌株致病型复杂多样, 远远高于国内其他省份测试的致病型。

关键词:水稻白叶枯病; 遗传多样性; 致病型; Rep-PCR

中图分类号: S435.111.49

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0026-05

Analysis of genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Rep-PCR

Ji Guang-hai, HE Yue-qiu, ZHANG Shi-guang, QIAN Jun

(Key Lab for Plant Pathology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Fifty-six strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) were analysed by using short bacterial repetitive elements (REP, ERIC and BOX primers) and the repetitive DNA element IS1113 from *X. oryzae* pv. *oryzae*. Dendrograms were generated from the combination data sets of primers ERIC and J3 by using UPG-MA analysis. The results indicated that extensive genetic variability and genetic diversity existed within the population of *X. oryzae* pv. *oryzae* strains tested. All strains could be divided into 10 groups at level of 70% similarity. Group 4, 5, 8, 9 and 10 were predominant. Strains collected from Yunnan Province were divided into 6 groups, and each group was partially associated with the regional origin of pathogen population. Eighteen pathotypes (virulence phenotype) were identified by using 16 near-iso-genic rice lines, each containing a single gene for resistance. The pathotype diversity and complicity of strains tested from Yunnan Province were higher than those from other provinces in China. The results would be facilitated for further understanding of the population structure of *X. oryzae* pv. *oryzae* in China.

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; genetic diversity; pathotype; Rep-PCR

水稻白叶枯病 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 是亚洲危害水稻生产的重要病害之一。水稻白叶枯病菌是稻黄单胞菌 *X. oryzae* 种下的一个致病变种, 了解其群体遗传变异和致病小种的变化, 是抗性基因品种选择和利用品种布局控制减轻病害的基础。病原菌群体遗传多态性和小种的变化原因主要有病原菌的遗传变异(农业和环境胁迫下的突变和重组)和从其他地区迁移过来。揭示植物病原细菌遗传变异的

技术日趋成熟, Rep-PCR 是基于基因组重复序列的一种 DNA 多态性, 操作简便、重复性好, 用于 Rep-PCR 指纹分析的重复序列主要有针对细菌基因组中广泛分布的短重复序列 (REP、ERIC、BOX) 和水稻白叶枯病菌基因组中发现的插入因子 (IS1113、IS1112), 此技术在国内外已广泛用于研究水稻白叶枯病菌的群体遗传变异^[1,2]。但不同引物, 经 PCR 扩增所揭示的水稻白叶枯病菌群体遗传多态性不同。王春莲等^[3]利

用 Rep-PCR 指纹技术对我国长江以南地区水稻白叶枯病菌的遗传多样性进行了分析, 但其中包括西南地区特别是云南省的菌株较少, 得出的结果尚不能全面代表云南省情况. 本文采用 Rep-PCR 技术, 结合已知基因型的近等基因系鉴别小种, 进行了白叶枯病菌的群体结构分析.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

水稻白叶枯病菌株包括来自云南省不同地区和国内已知致病型的标准菌株, 所有菌株经单菌落纯化, 液体保存在-70℃的低温冰箱中. 接种前用 PSA 培养基(酵母粉 1 g+牛肉浸膏 3 g+蛋白胨 5 g+蔗糖 15 g+琼脂 17 g+水 1 L, pH7.2)活化菌株, 于 28℃培养 2~3 d, 用无菌水洗下菌苔, 接种菌液浓度为 3×10^8 CFU/mL. 标准菌株由南京农业大学植物检疫研究室许志刚教授提供.

1.2 菌株染色体 DNA 的提取

将菌株接种在 PSA 液体培养基中, 28℃, 180 r/min, 振荡培养 36 h. 按李德葆^[4]的方法提取病菌基因组 DNA. 取 2 μL DNA 溶液于 7.5 mg/L 的琼脂糖胶上电泳, 电压为 4 V/cm, 用不同浓度梯度的 λDNA 作对照, 比较样品 DNA 带与 λDNA 带的亮度, 估算待测样品的 DNA 含量, 并稀释至终质量浓度约为 50 ng/μL.

1.3 Rep-PCR

1.3.1 供试试剂 10×扩增缓冲液(KCl 500 mmol/L, Tris-HCl 100 mmol/L, pH9.0, Triton x-100 0.1% (v/v)); MgCl₂ 25 mmol/L; 25 mmol/L dNTPs 混合液, 2.5 mmol/L(A, G, C, T) (Promega), 牛血清白蛋白(BSA) 850 μg/mL, 溶液分装 20 μL/管, -20℃保存; 灭菌双蒸水; Taq DNA 聚合酶 5 U/μL (Promega 公司); 石蜡油(Sigma)灭菌.

1.3.2 引物^[5,6] 引物序列是以细菌基因组的重复序列(Rep-ERIC、BOX)和白叶枯病菌存在的可移动重复序列因子(IS1113)为基础设计, 由大连宝生物有限公司合成. 引物稀释至 200 μmol/L, 分装, -20℃保存.

BOX: BOXIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3').

REP: REPIR-1(5'-IIIICGICGICATCTGGG-3'),
REP2-1(5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3').

ERIC: ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGATTAC-3'),

ERIC2(5'-AAGTAAGTACTGGGCTGACG-3').

IS1113: J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTCGCCTGG-3').

1.3.3 Rep-PCR 反应 5×gitscher buffer 2 μL, 2.5 μmol/L dNTP 1.6 μL, 20 μmol/L 引物各 1 μL, BSA 0.5 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL, 模板 DNA (10 ng/μL) 1 μL, 用双蒸水补足 20 μL, 加 20 μL 灭菌矿物油. PCR 扩增反应条件: 95℃预变性 7 min, 循环 35 次(变性 94℃1 min, ERIC、J3、BOX、REP 退火温度分别为 52、68、53 和 44℃; 最后 65℃延伸 15 min, 将 PCR 产物 4℃保存. 扩增采用 Perkin Elmer 9600 热循环仪进行.

1.3.4 Rep-PCR 扩增产物琼脂糖检测 取 6~8 μL 扩增产物于 15 mg/L 琼脂糖胶上电泳分离, 电压为 4 V/cm, 时间为 5~6 h, 电泳完毕, 溴化乙锭染色, 脱色, 于紫外灯下观察结果, 并用 Image Master 紫外成像系统进行图象采集和保存, 初步分析后, 选取电泳效果好的用于 Synigel 电泳.

1.3.5 Rep-PCR 扩增产物 Synigel 凝胶电泳检测 扩增产物用(5.0 mg/L Agarose+7.5 mg/L Synigel)混合胶进行电泳, 电压降为 2 V/cm, 10 h 后染色, 清水漂洗脱色, 检测, 摄影.

1.3.6 聚类分析 对 Rep-PCR 扩增产物凝胶图谱进行读带, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 制成 Excel 文件, 使用 Statistic 统计软件, 采用 Percent Disagreement 计算, 并用非加权组对平均数聚类法 UPGMA 进行聚类分析, 构建系统树状图谱.

1.4 致病性测定

选用从国际水稻所引进的一套含轮回亲本 IR24 在内的携带不同抗病基因的近等基因系(NILs), 在水稻分蘖盛期和孕穗期, 以菌悬液浓度为 3×10^8 CFU/mL, 采用剪叶法接种上部平展叶, 每一处理至少接种 10 张叶片. 接种 20 d 后测量病斑长度, 参照文献[7, 8]列出的分级标准划分抗感类型, 并进行小种的分析, 比较菌株间的致病性差异.

2 结果与分析

2.1 水稻白叶枯病菌株的 DNA 提纯和引物筛选

本试验所提取的 DNA 纯度较高, 少部分菌株虽然浓度低, 但均可满足 PCR 分析. 由于白叶枯病菌在培养过程中产生大量胞外多糖, 检测时常发现 DNA 溶液为一团粘稠状物, 因而在抽提前用 8.5 mg/L 的 NaCl 溶液洗涤菌体 2、3 次并加入 CTAB 去糖; 另外用酚/氯仿/异戊醇多次重复抽提后, 效果较好. 本研究用 4 个引物 (BOX、ERIC、REP、J3) 对水稻白叶枯病菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增反应, 通过比较选出 2 个扩增片段数目多, 谱带清晰, 能较好反映

菌株间多态性的引物 J3 和 ERIC.

2.2 水稻白叶枯病菌的 DNA 指纹图和聚类分析

DNA 指纹图结果详见图 1. 图 1a 针对 ERIC 重复序列的 DNA 指纹图谱中, 所有测试的菌株共有 18 种单元型, 云南的菌株显示较多的指纹图谱, 共有 14 个, 来自我国其他省份的菌株指纹图谱相似程度高, 测试菌株的单元型较少. 图 1b 针对白叶枯病菌的插入因子 IS1113 的 DNA 指纹图中显示: 片段大小范围为 100 bp ~5 kb, 谱带数为 1~16 条, 测试的云南 29 个代表菌株分为 16 个单元型. 对 ERIC 和 IS1113 的

扩增电泳图谱数据进行综合聚类分析, 获得遗传相似图(图 2). 从聚类图中可以看出, 在遗传距离为 0.3 时, 测试的 56 个菌株可分为 10 个遗传相似组, 4、5、8、9、10 为主要组群, 其中第 4 组群为我国已知致病型的参试菌株, 共由 25 个菌株组成. 在遗传距离为 0.2 时可细分为 19 个亚群, 第 7 亚群仍有 N14、OS35、XOO 172、OS26、HB8417、J4、KS-6-6、SCT4、BJ84-3、OS144、IR79、X-S-2、OS93、JS147-4、OS6、ZJ27 共 16 个菌株组成. 其他亚群分别有 1、2 个菌株组成. 在遗传距离为 0.3 时, 云南省白叶枯病菌株与国内其

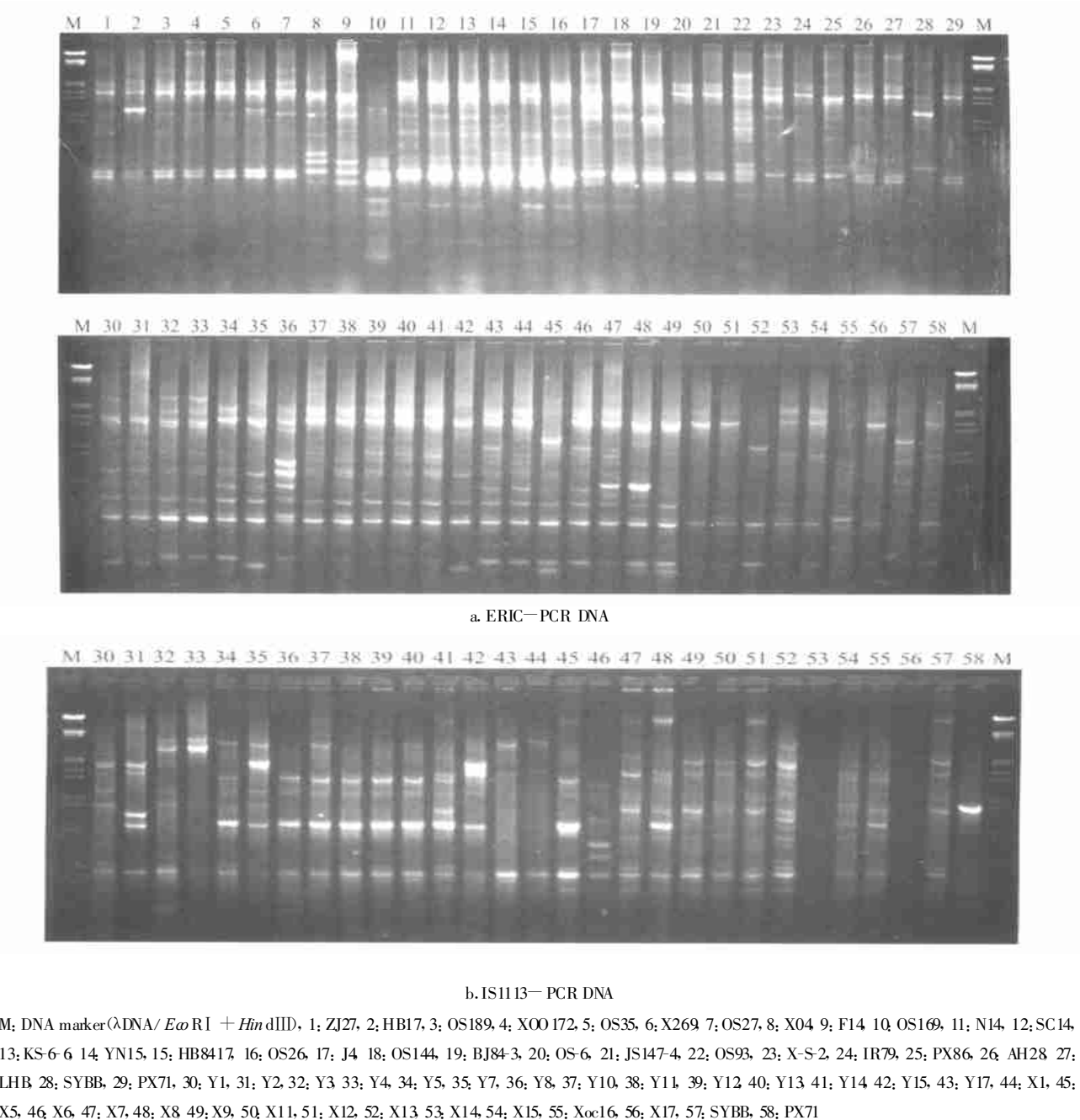


图 1 水稻白叶枯病菌 ERIC-PCR 和 IS1113-PCR DNA 指纹图

他省份的参试菌株间遗传差异明显, 容易区分开来, 分属于 6 个群中, 遗传分群与菌株的地理来源关系密切, 如第 6 群(菌株 X1、X6、X7)、第 10 群菌株(Y1、Y2、Y7、Y15、)主要来自云南省红河州的金平、开远和建水等地, 第 8 群(包括 Y10、Y11、Y12、Y13、Y14), 主要来自大理州的大理、宾川县等地, 第 9 群菌株(包

括 X8、X9、X11、X12、X17 等), 主要来自滇中的楚雄、玉溪等地.

2.3 水稻白叶枯病菌致病型多样性研究

根据水稻白叶枯病菌在 16 个已知抗病基因品种上的反应, 进行水稻白叶枯病菌的致病性分化研究. 结果(表1)表明, 所有测试菌株对IR24、IRBB2

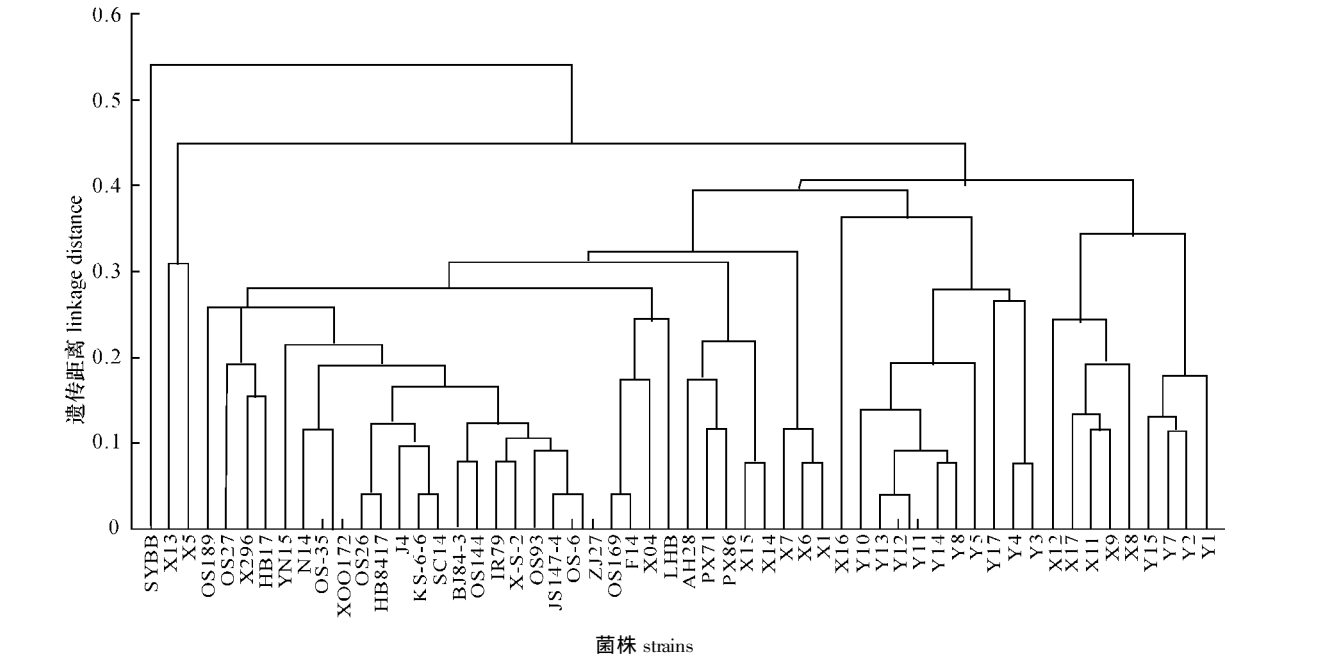


图 2 供试水稻白叶枯病菌菌株的 UPGMA 聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 56 representative strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* generated by UPGMA cluster analysis

表 1 水稻白叶枯病菌小种在 7 个鉴别品种上的反应模式

Tab. 1 The response patterns between 21 races on 7 differentials

致病类型	鉴别品种 ¹⁾ differentials							代表菌株
pathotype	丰锦	BB1	BB14	BB3	BB4	BB5	BB21	representative strains
0	R	R	R	R	R	R	R	OS189, JS147-4, Q10
1	S	R	R	R	R	R	R	Yun15, OS27
2	S	S	S	R	R	R	R	OS209, SYBB, OS35, KS-6-6, SC14, JS14, Q7-4
3	S	S	S	S	R	R	R	Y1, Y2, Y4, X4, X5, OS26, J4, OS169
4	S	S	R	R	S	R	S	X7, OS172, BJ84-3, OS144, IR79
5	S	S	S	R	S	R	R	HB8417, PX71
6	S	S	S	S	S	R	R	X296, XS2, OS93, X04, LHB
7	S	S	S	S	R	R	MS	Y16, Y17, ZJ27, OS6
8	S	S	S	S	S	R	R/S	Y7, Y8, Y15, X10, Q4, AH28, PX86
9	S	S	R	R	R	S	MS	X9, Q9
10	S	S	R	S	S	R	R	Y3
11	S	S	S	S	R	S	R	X1, Y5, Y11, X15, X13
12	S	S	S	S	S	S	S	Y6, X6
13	S	S	R	S	S	S	S	Y10, Y14, X14
14	S	S	S	R	S	R	S	X8, N14, F14
15	S	R	R	R	R	S	R	X11
16	R	S	R	R	R	S	R	X12
17	S	S	R	S	R	S	R	X17

1) 丰锦: Toyonishiki (Xa-18), BB1: IRBB1 (Xa-1), BB14: IRBB14 (Xa-14), BB3: IRBB3 (Xa-3), BB4: IRBB4 (Xa-4), BB5: IRBB5 (Xa-5), BB21: IRBB21 (Xa-21); R: 抗病, S: 感病, MS: 中感; R/S: 抗病/感病

(*Xa-2*)、IRBB10 (*Xa-10*)、IRBB11 (*Xa-11*)、Tetep (*Xa-16*)、和丰锦(*Xa-18*)等品种的致病力强,各品种表现为感病. 本研究中根据菌株在鉴别品种上抗感反应的差异和对含有抗白叶枯病基因 *Xa-21* 的致病性,测试的菌株属于 17 个致病型(小种),暂分别称作 0~17. 其中云南省水稻白叶枯病菌除具有与国内采用同样鉴别品种划分的 0~8 号小种外,还有其他 9 个小种. 表明云南省的水稻白叶枯病菌小种组成复杂,具有一定的地域特殊性.

3 讨论

3.1 水稻白叶枯病菌的遗传多样性及适宜引物

本研究对 56 个水稻白叶枯病菌进行遗传多态性分析,通过比较选出适宜水稻白叶枯病菌分析的重复序列 2 个:ERIC 和 IS1113. 其他引物如 REP 重复性差,而且扩增效率非常低,BOX 重复序列的扩增条带虽然较清晰,但对白叶枯病菌株的分辨率低,不能有效地区分菌株间的遗传差异. 另外,云南省水稻白叶枯病菌遗传多样性丰富,其遗传分群与地理来源关系密切. 研究结果还发现来自我国其他省份的参试菌株,尽管菌株多,但遗传指纹相似程度高,这与 Zhang^[2], 孙启明等^[8] 的研究结果一致. 王春莲等^[3] 对我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌株的遗传多样性分析时,提出云南省的菌系很是特殊,与国内其他省份差异较大,本文试验结果也证明了这一点. 这可能与云南省稻种资源丰富、低纬度、高海拔、气候类型复杂多样有关.

3.2 水稻白叶枯病菌致病小种分化

利用近等基因系可有效区分白叶枯病菌株的小种分化. 从试验结果看,云南省水稻白叶枯病菌小种组成复杂,具有独特性. 孙启明^[8] 将 100 个白叶枯病菌株区分为 8 个小种,而云南省采集的菌株采用同样的鉴别品种,可划分出 18 个致病型,并发现能克服已报道的主要抗白叶枯病基因的强毒性菌株,这为筛选新的抗病基因提供了菌株材料(另文发表);王春莲等^[3] 采用我国传统的 5 个鉴别品种,测试云南的 11 个菌株,也发现新的致病类型,占测试菌株的 41.7%. 本研究也发现抗病基因与病原菌的互作反应模式与国内其他地方的菌株略有不同,如 *Xa-21* 基因对我国绝大部分菌株表现为高抗,但云南已发

现一些菌株能克服抗病基因 *Xa-21* 的抗性. 这与广东曾列先等^[9] 报道的情况一致. 另外,韩国、印度和尼泊尔等国已报道存在大量对 *Xa-21* 有强致病力的菌株^[10~12]. 因此,在进行抗病基因布局时,应考虑当地水稻生态区白叶枯病菌系的群体组成.

参考文献:

[1] VERA CRUZ C M, ARDALES E Y, SKINNER D Z, et al. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by Rep-PCR and RFLP analysis [J]. *Phytopathology*, 1996, 86: 1 352—1 359.

[2] ZHANG Q, LEACH J E, NELSON R J, et al. Genetic structure of rice bacterial blight pathogen population in China[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1997, 23(3): 150—158.

[3] 王春莲, 章琦, 周永力, 等. 我国长江以南地区水稻白叶枯病菌遗传多样性分析[J]. *中国水稻科学*, 2001, 15(2): 131—133.

[4] 李德葆, 徐平. 重组 DNA 的原理和方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1996. 130—132.

[5] 姬广海, 魏兰芳, 张世光. Rep-PCR 技术对中国水稻条纹病菌的遗传多样性初析[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(1): 26—32.

[6] WONG H C, LIN C H. Evaluation of typing of vibrio parahaemolyticus by three PCR methods using specific primers[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(12): 4 233—4 240.

[7] 姬广海, 张世光, 钱君, 等. 云南水稻白叶枯病生理小种初析[J]. *植物保护*, 2003, 29(1): 19—21.

[8] 孙启明. 水稻白叶枯病菌小种鉴别标准化及群体遗传结构的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2001.

[9] 曾列先, 黄少华, 伍尚忠. IRBB21(*Xa-21*)对广东水稻白叶枯病菌 5 个小种的反应[J]. *植物保护学报*, 2002, 29(2): 97—100.

[10] ADHIKARI T B, MEW T W, LEACH J E. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal[J]. *Phytopathology*, 1999, 89: 687—694.

[11] CHOI S H, VERA CRUZ C M, LEACH J E. Distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* DNA modification systems in Asia[J]. *Appl Environ Micro*, 1998, 64(5): 1 663—1 668.

[12] YASHITOLA J, KRISHNAVENI D, REDDY A P K, et al. Genetic diversity within the population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in India[J]. *Phytopathology*, 1997, 87: 760—765.

【责任编辑 周志红】